

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月20日

(51) Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		9161-4B	
C 0 7 K 16/00		8318-4H	
16/18		8318-4H	
16/32		8318-4H	
		9050-4B	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-514437  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月10日  
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/12039  
 (87) 国際公開番号 WO94/13806  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)6月23日  
 (31) 優先権主張番号 990, 263  
 (32) 優先日 1992年12月11日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

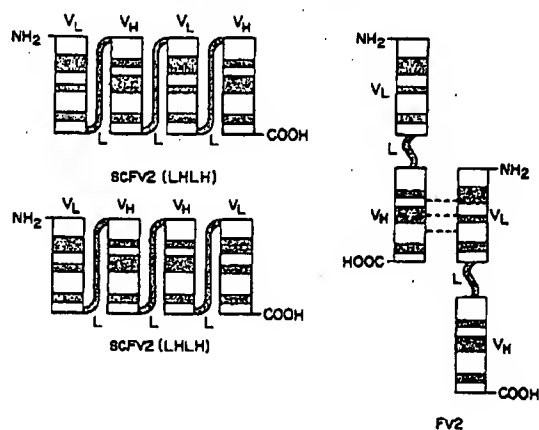
(71) 出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー  
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット ロード, ダウ センター 2030  
 (72) 発明者 メゼス, ビーター エス.  
 アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25  
 (72) 発明者 ゴーリー, プライアン ビー.  
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード ドライブ 3713  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敏 (外3名)

(54) 【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

## (57) 【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解



特許(内容に変更なし)

## 請求の範囲

1. 2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードするDNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

特許(内容に変更なし)

## 明細書

多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能を果たす。

アミノ酸配列データベースは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診

- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエロマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にわたるネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合せられたものが組換えDNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1068-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-219 (1987); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、恒久的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV<sub>L</sub>と一本のV<sub>H</sub>とにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

ー (米国特許第 4,946,778号) により連結された  $V_L-L-V_L$ 。ポリペプチドを成しており、ここで  $L$  はペプチドリンカーを設けている。 $V_L$  と  $V_H$  ドメインが配向  $V_H-L-V_L$  である scFv が米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の 2 つの結合部位と比べて scFv は一つのそれを有するため、scFv は 2 以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有する scFv の構築体を得ることが有利であろう。加えて、領的組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベース増強を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体摘理を可能とする二価特異的である多価 scFv を獲得することが有利であろう。それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の  $V_L$  と一本の  $V_H$  ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できうることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は 2 本以上の軽鎖可変ドメインと 2 本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び  
(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；  
を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；  
を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管通過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が 2 種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、 $V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$  (LHLH) と  $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$  (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型 P<sub>v</sub> 一本鎖抗体 (Pv2) を示す。

図 2 は CC49V<sub>L</sub> のヌクレオチド配列を示す。

図 3 は CC49V<sub>H</sub> のアミノ酸配列を示す。

図 4 は CC49V<sub>H</sub> のヌクレオチド配列を示す。

図 5 は CC49V<sub>L</sub> のアミノ酸配列を示す。

図 6 は p49LHLH における CC49 一本鎖抗体 LHLH のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 7 は p49LHHL における CC49 一本鎖抗体 LHHL のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 8 はプラスミド pSL301T 及び pSL301HT の構築を示す。

図 9 はプラスミド p49LHLH の構築を示す。

図 10 はプラスミド p49LHLH の構築を示す。

図 11 は CC49IgG、CC49scFv2 及び CC49scFv を用いた、競合因子としてビオチニル化 CC49IgG を用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に超入れる。

核酸、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらは IUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の実際に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv) 又は「抗体フラグメント」なる語は、 $V_L-L-V_L$  により表わされる、ペプチドリンカー (L) により  $V_H$  ドメインに連結された  $V_L$  ドメインを含むポリペプチドを意味する。 $V_L$  と  $V_H$  ドメインとの順序は逆であってよく、 $V_H-L-V_L$  として表わされるポリペプチドが獲得できうる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した 2 以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ ； $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ ； $V_H-L-V_L-L-V_H-L-V_L$ ；  
又は

$V_H-L-V_L-L-V_L-V_H$

の  $V_L$  と  $V_H$  ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成している。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された 1 又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 $V_L$  と  $V_H$  ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_H-L-V_H-L-V_L-L-V_L$  又は  $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H$

で表されうる多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$  (LHLH) 及び  $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$  (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図 1 に示す。非共有結合型 P<sub>v</sub> 一本鎖抗体 (Pv2) も図 1 に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び／又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起原が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起原から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された Kabat らの Sequences of Proteins of Immunological Interest 第 4 版 (1991) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を開示している。遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

源として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1980)を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できうる。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物ととして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は課題の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施される。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。

課題の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願NO 80/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願NO 89/00692に開示されている、腫瘍関連タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開NO 90/04410及びNO 89/00692に

おいてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>をコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結するための適当なリンカーは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものとの構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,946,778号に開示の方法により獲得できうる。この第4,946,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できうる。

好ましくは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantollanoらのBiochem., 30, 10117-10125 (1991)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXhoI部位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンで理由に変えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Lau-Sar-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性種に由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(*E. coli*)はpBR322を用いて容易に形質転換される(9olivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できうる。S. セレビジェ(*S. cerevisiae*)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(*Pichia pastoris*)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/O又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できうる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC); pSVL及びpKSV-10 (Pharmacia), p9PV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウィルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処置し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助長するために必要とされる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換えDNA技術を用いて構築されたベクターにより組換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養増殖の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この態様において、かかる拘束的な形質転換細胞の培養物は生存のために誘発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成される。例えば、もしそれらが培養増殖の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、且つ屈折体 (refractile bodies)、通称封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えば Guanidinium-HCl による可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 及びラジオイムノアッセイ (RIA) により測定できうる。

IEP	等電点電気泳動
Kbp	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MBS	2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド
PAG	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCFVをコードする DNA配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scPv	一本鎖Pvイムノグロブリンフラグメントモノマー
scPvs	共有結合した一本鎖Pvイムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)
TTBS	ツイーン20洗浄液
V <sub>H</sub>	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V <sub>L</sub>	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 抗体

CC49: ヒト腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として寄託。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表層上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって結合されうる。本発明の薬理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

#### 略語

BCIP	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Tris	プロパン (1, 3-ビス (トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミノ) プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Pv2	非共有一本鎖Pvダイマー

CC49FAB: 重鎖のN-末端領域に連結している完全軽鎖より成るCC49の抗原結合性領域。

CC49scPv: ペプチドリンカーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Pv2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scPv。Pvの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Pv8は八量体の多量体を意味する。

CC49scPv2: 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC49V<sub>H</sub>ドメインと2本のV<sub>L</sub>ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V<sub>H</sub>(L)とV<sub>L</sub>(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHLH, LLHH, HLLH, HLHL及びHHLL。

#### プラスミド

pSCFV<sub>UHM</sub>: 25のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変軽鎖とCC49可変重鎖とより成るscPvについてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHHL: CC49scPv2 LHLH又はLHHL生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 実施例

##### 一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することによって本明細書に組入れる。Sanbrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第2版 (1989) 及び Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準の $\beta$ -シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40 $\mu$ lの滅菌水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム(Millipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを90%のメタノールで溶解させることによって行った。その溶液の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm(OD<sub>260</sub>)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BM, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により可視化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Union Carbide Corp., Chicago)の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置(Hoefer Scientific Instruments,

より測定した。scPv2の結合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20 $\mu$ l)を、非還元用サンプル調製バッファSepasol 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド Daiichi Minigelにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリリアントブルーR-250(Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め染められており(Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼ、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オパールブミン、ラクトートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、 $\beta$ -ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000, 55,000, 43,000, 36,000, 29,000, 19,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファ#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15~20分平衡にした。Immobilion-P PVDP(ポリビニリデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一面の陽極バッファ#1を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM 濾紙のシートを陽極バッファ#1の中に浸し、そしてその電

CA)を用いて溶解させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調製したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイタープレート(Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 $\mu$ lのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25 $\mu$ lの試験抗体及び25 $\mu$ lのビオチニル化CC49(1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余剰な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscPvによる競合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 $\mu$ g/mlのCC49及び10 $\mu$ g/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又は濃縮LBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの抱合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50 $\mu$ l(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 $\mu$ lのパーニトロフェニルホスフェート溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scPv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404~450 nmでの光学密度スキャンに

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファ#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDP膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファ(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH8.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電流(初期電圧は8~20ボルトに範囲した)を用いて30分で達せられた。

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、周囲温度でブロックし、そして20mlずつの0.5%のツイーン20洗浄液(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTBSのリッター当り混合した。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化PAID 14溶液とした(10 $\mu$ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当たり1gのBSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を周囲温度において30~60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの抱合されたストレプトアビジン(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, pH9.9とした。アルカリホスファターゼにとっ

ての高質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色膜からそれらを水で洗い流した。

#### バイオニル化 FAID 14

FAID 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イディオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。FAID 14を Nygene Protein Aアフィニティカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコルに従ったが、ただし溶離バッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。固相を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH 7に中和した。バイオニル化反応は下記の通りに設定した。FAID 14(1mg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 9.6と混合した。バイオニル-e-アミノ-カプロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20μl)をFAID 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のバイオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8ml/minの流速で、バイオニル化 FAID 14は16.8minのピークで出現した。このピークを構成する固相をプールし、そして4℃で保存し、そしてCC49V<sub>1</sub>及びV<sub>2</sub>CDRにより決定

されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

#### 等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR (Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータプログラムを用いて決定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、Isogelアガロース IEPプレート、pH域3~10(PMC Bioproducts, Rockland, NJ)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルも、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEP標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、β-ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンチルレクチン及びチトクロームCを含み、それらのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び9.80である。ゲルを、PMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

#### CC49抗体種の定量

IgG, scFv2の種および単量体scFvを含む精製CC49抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびParkin-Elmer UV/VIS 分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E<sub>1</sub>)は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_1 = (\text{Trp数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 + ((\text{Cys})^2 \text{数}) \times 150 + (\text{Phe数}) \times 10$$

これらの値は、D.B. Wetlauffer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375~378頁に記載されている情報に基づいている。

#### 高性能液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、金体にチタンまたはテフロン製配管を用いたLK8 HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、278nmの吸光度に設定されたUV CORD S II 2236型検出装置および2211型 SuperRac fraction collectorで構成されている。

#### サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド標的(pSCFVUHM)：100ピコモルのプライマー：1μlのParkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク所在)のAmpli-Tagポリメラーゼ：18μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている)：ならびに合計容積を100μlにするのに充分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94℃で20~45秒間のDNAの変性；52~60℃で0.5~1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の380A型もしくは381型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

#### リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20μl)は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

#### 形質転換

形質転換は、100μlのStratagene社の大腸菌(E. coli) AG1コンピテント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA(1~5μl)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス(LB)中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCFVUHM, p49LHLHもしくはp48LHLHに用いる20μg/mLのクロラムフェニコール含有(CAM20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100μg/mLアンピシリン(AMP100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

#### 大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagIcミニプレッププラスミド製造キットを用いて、淘汰圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

#### プラスミドの構築

p49LHLHおよびp48LHLHと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p48LHLHを含有する宿主細胞は、V<sub>1</sub>-L-V<sub>2</sub>-L-V<sub>3</sub>-L-V<sub>4</sub>で表すことができるポリペプチドを産生した。ここでV<sub>1</sub>とV<sub>2</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LHLHを含有する宿主細胞は、 $V_L$ -L- $V_H$ -L- $V_L$ -L- $V_L$ で誘導することができるポリペプチドを産生した。ここで $V_L$ と $V_H$ はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびは上記アミノ酸配列を有するペプチドリッカーである。

CC49V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>(p49LHLH)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC49V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>(p49LHLH)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 8)を図7に示す。

#### pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)のペニシリナーゼP (penP) ターミナーターの配列を、NheIおよびBamHIで45分間消化することによって、pSCPV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させ、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301 (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCPV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出版の米国特許第07/935,885号に記載されている。なおこの出版の開示事項は本願に援用するものである。一般に、pSCPV UHMは、penPプロモーターのヌクレオチド配列：固有NcoI制限部位；CC49V<sub>L</sub>領域；HindIII制限部位；25個のアミノ酸のリンカー；固有XhoI制限部位；CC49V<sub>H</sub>領域；NheI制限部位；penPターミナーター；およびBamHI制限部位を含有している(図8参照)。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Mezgerら、J. Biol. Chem., 258巻、

11211~11218頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3μL)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサースバーグ所在)のT7 Quickprime<sup>®</sup> DNA標識キットと、Bulowelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ液によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-NheI-BamHIターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamHIおよびNheIによる消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1858~2185の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301Tと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。NheI-BamHI penPターミナーターをpSL301中に配置した理由は、そのNheIとBamHIの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構造体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要がある $V_L$ と $V_H$ の領域を結んで構築するため設計された。各V領域がEco47III-NheI部位に付加されると、Eco47IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

$V_L$ 配列は、PCR増幅の標的としてpSCPV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3' オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAC-3'

SCP5: 5' -TAA GCT ACC ACCA AGC GCT TAG TCA GCA GAC GCT CAG TCA GCT-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅された $V_H$ DNAを、4%のPAG、電気泳動、エタノールによる沈殿および20μL水への溶解によって精製した。その $V_H$ 配列をXhoIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化された純粋に精製されたpSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4μL)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49V<sub>H</sub>インサートを含有していることを示す機能的クローンをNheIおよびXhoI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB) 社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB(pSL301ベクター中、XhoI部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC49VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、CC49V<sub>H</sub>の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49V<sub>H</sub>配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-HLHTおよびpSL301-HLHTの両者を構築するときの出発点で使った。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12)およびCC49V<sub>H</sub>(SEQ ID NO: 13)のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC49VHP: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

#### 実施例1 p49LHLHの構築

pSL301HT(5μg)を出発物質として用い、これをEco47IIIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49V<sub>L</sub>挿入フラグメントは、5'オリゴとしてSCP6Cを用いつつ

3'オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP68のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記の通りである。

SCP6B: 5' -TAA TCC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC GTT CAG TTG CAG CAG  
TCT-3'

またオリゴSCP6Bはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp8~78)を含有している。pSCPV UHM中のCC49VH標的のアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、PspIとNheIで消化し次いでpSL301HT-Eco47III-NheIベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(3μL)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXhoI-NheIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSQPIを用いて決定し、正しい配列(図7のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SQPIのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記の通りである。

SQPI: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカー $V_L$ サブユニット(bp1544~1963、図4)は、5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP8aを用いつつPCRの標的としてpSCPV UHMを用いて製造した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記の通りである。

SCP7b: 5' -TAA TCC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAT GTT ATG TCA CAG TCT  
CC



下線をつけたヌクレオチドは PspI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18) は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC  
CAG CTT GGT CCC-3'

下線をつけた最初の二組は NheI 部位に相当し、もう一つの組は AflII 部位に相当する。SCP7Dのヌクレオチド9~76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1544~1612)、一方V<sub>L</sub>にアニールするヌクレオチド77~99は図7の1613~1635に相当する。プライマー SCP9aは、その5'末端の短いテール、NheI制限部位、終止コドン、AflII制限部位およびV<sub>L</sub>の最後の21個の塩基を含有している。PspIとNheIによる消化の後、この得られた420bpのインサートを精製して精製pSL301HHTベクターのNheIとEco47IIIの部位に連結し、候補的なクローンをNheIとXhoIでスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ49LFR2(-)とSQP1で配列が決定されて、pSL301HHT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 19) は下記のとおりである。

49LFR2(-): 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミドpSL301HHTをXhoIおよびNheIで消化し、精製し、得られた1179bp V<sub>L</sub>-リンカー-V<sub>L</sub>-リンカー-V<sub>L</sub>、セグメントをpSCPV UHMに連結してp49LHLHを製造した。なおこのpSCPV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4μl)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBCAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHLHを含有させるために選択した。p49LHLHは、CC49多価一本鎖抗体 scPv2: V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>またはCC49scPv2 (LHLH)のgenPプロモーターとヌクレオチ

D配列を含有している。

#### 実施例2: p49LHLHの構築

p49LHLHの構築を図11に図式的に示す。リンカーV<sub>L</sub>のサブユニットを5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC  
AGC ACC AGC TTG GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8~78)は図8のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124~1192に相当する)および図8のV<sub>L</sub>のヌクレオチド1193~1215に相当する。PCRに対するpSCPV UHM鎖的(ヌクレオチド77~99)にアニールした。

SCP9は、NheI部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)とEco47III部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるためのpSL301HHTを作るのに必要な制限部位である。SCP9のヌクレオチド18~23は図9のヌクレオチド1532~1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24~49は、PCRにおけるSCP9のアニール領域である図9に示すヌクレオチド1508~1531に相当する。プラスミドpSL301HTをEco47IIIとNheIで消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予めPspIとNheIで処理され精製された、PCRからのリンカー-CC49V、DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3μl)を用いて大腸菌AG1コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しいXhoI-NheIの大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴPBNPTSEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 21) は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL301HTクローン中にPCRの誤まり

と欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533~1537に相当する5個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531はDNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCTT...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然にEco47III部位を形成した。図9のAGCGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴSCP8Cの末端に5塩基の欠失を繰込むことによってpSL301HHTを製造した。

SCP8C: 5' -TAAGCGCTGATGATGCTAAGAAGCAGCGCCGCAAAAA  
GGACGACGCAAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTGC  
AGGTTTCAGTTGCAGCAGCTCTGAC-3'

SCP8C中の下線をつけた配列はEco47III部位に相当する。PCRにおいて、SCP8Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP10は3'オリゴとして用いられ、リンカーCC49V、セグメントが生成する。SCP10のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23) は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGC AGA CGG TGA  
CTG AGG TT-3'

SCP10中の下線をつけた配列は図8のヌクレオチド1959~1993に見られるNheI部位に相当する。この場合、PCRインサートはNheIだけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL301HHT)はEco47III部位(先に形成されている)およびNheI部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3μl)を使ってコンピテントイー・コリAG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローンをXhoIとNheIでスクリーニングした。正しい大きさ

のDNAを有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLCOR3(+)およびSQP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCOR3(+))のDNQ ID NO: 24) は下記のとおりである。

49VLCOR3(+): 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図8のヌクレオチド1533~1993からの配列が確認され、正しいpSL301HHTクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミドp49LHLHを製造するために、pSL301HHT(5μg)をNheIとXhoIで消化し、次いでV<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM(5μg)をXhoIとNheIで消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4μl)を使ってコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAM20プレート上にプレートし、次いでp49LHLHに対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)およびTAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

#### 実施例3 CC49 scPv2のLHLHとLHHLが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scPv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の園分を、p49LHLHとp49LHHLの両者の1.DLの一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を250mlづつの4部分に分割し、Sorvall GS-3ロータで10分間5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mMトリス-HCl pH 7.3からなる100ml中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mlの30mMトリス-HCl pH 3で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v%

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL) および10 mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞 (hypertonic cell) を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの水に0.5mM MgCl<sub>2</sub>中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の画分を含有する上澄み液を、0.2μmのNalge社 (米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在) の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社 (米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在) のCentriprp 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたはp49LHHLのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショック (shockate) を、Pharmacia社 (米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在) のSuperdex 75 HR 10/30 HPLC カラム (予めPBSで平衡化させたもの) に注入した。競合ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性画分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit (Pierce Chemical社) を用い、緩衝液を3~4回変えながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.8に対して一夜透析を行った。その試料をPharmacia社のMono Q HR 5/5アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の画分の、二つのSDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウェスタン分析 (ブローブ抗体としてビオチニル化 PAID 14を使用) に移されたが、scPv2(LHLHまたはLHHL) の種の計算分子量の単一バンドが、58,238ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いでPharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの画分の5と6は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に除去された。したがってこれらの画分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで画分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S画分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.8mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

#### 等電点電気泳動

構築物の等電点 (pI) はDNASTAR社 (米国、ウィスコンシン州、マディソン所在) のコンピュータプログラム Protein-titrateを使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PMC Bioproducts社 (米国、メーン州、ロックランド所在) のIsogel IEPプレートpH範囲3~10を使用して測定した。上記IEPを操作するために、Biorad社 (米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在) の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V (限定) および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社のIEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.85, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 7.8, 9.00, 8.20 および9.8であった。ゲルはPMCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTAR プログラムによって両方のscPv2の種のpI値として8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の8.9の位置にみとめられた。

IgG, scPv2 (LHLHおよびLHHL) のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数値E<sub>m</sub>は各々、先に引用したWetliwferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scPv2LHLH, CC49scPv2LHHLおよびCC49acPvのE<sub>m</sub><sup>280nm</sup> (280nm)値はそれぞれ1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

#### 実施例4

CC49scPv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびC00H末端にPLAGペプチドを有する単量体scPv型と比較した。

パーセント競合(percent competition) を下記式によってELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合}-\text{試料競取り値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合}-100\% \text{競合}} \times 100$$

"ゼロ競合(zero competition)" 値は、1% BSAをビオチニル化CC49 (3×10<sup>-14</sup>モル) と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合値はビオチニル化CC49IgGと混合したCC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は405nm~450nmで測定した。3回の競取り値の平均値を使

用した。最初に試料 (25μL) を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10.10モルの結合部位/mLで塗布した。ビオチニル化CC49 (4μg/μL 1:20,000に希釈、25μL使用) で試料を1/2濃度に希釈した。連続希釈法 (1:2) を行った。両方の形態のscPv2はIgGには等しい (図11参照)。別の試験で、CC49scPv単量体をFabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらはTAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scPv2分子が、そのCC49IgGの種と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存のIgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

FIGURE 1

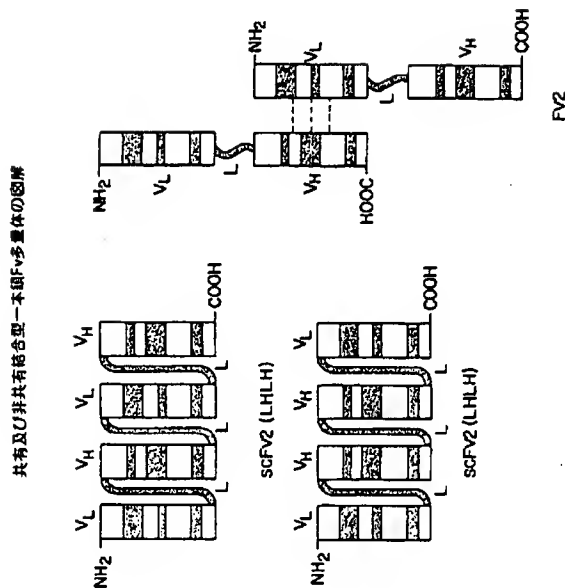


FIG. 2

[illegible]

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val  
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu  
Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg  
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala  
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

FIG. 4

[illegible]

FIG. 5

Glu	Val	Gle	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr
Asp	Ile	Ala	Ile	Ile	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Asp	Phe	Lys	Tyr
Asn	Glu	Arg	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Val	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
Ser	Ala	Val	Tyr	Ser	Cys	Thr	Arg	Ser	Leu	Asn	Met	Ala	Tyr	Trp
Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser				

FIGURE 6

浄書(内容に変更なし)

CC49 VL-1-VH-1-VL-1-VH-DNA及UP3ノ塩配列

[illegible]

FIG. 6D

240  
 Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Phe Trp Gly Gln Thr Ser  
 TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA  
 250  
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala  
 GTG ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT  
 260  
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Ala  
 AAA AAA GAG GAT GCC AAA AAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT CTT GAC ATT  
 270  
 Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys  
 GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCG TCC CTA CTT GTG TCA GTT GGC GAG AAG  
 280  
 Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Gln Ser Leu Leu Thr Ser Gly Asn  
 GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC ACT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT  
 290  
 Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT  
 1102  
 1150  
 1198  
 1246  
 1294  
 1342

FIG. 6B

50  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp  
 TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG  
 60  
 Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly  
 GGA TCC GCT AGC GAA TCT GGG GTC CCT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT  
 70  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Gln Asp  
 TCT GGC ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC  
 80  
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe  
 CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCG CTC AGC TTC  
 90  
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys  
 CCT GCT GGC ACC AAG CAG CTG CTG AAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG AAA  
 100  
 Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys  
 AAG GAT CCT GCG AAG AAG AAG GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT  
 110  
 120  
 130  
 140  
 150  
 160  
 170  
 180  
 190  
 200  
 210  
 220  
 230  
 240  
 250  
 260  
 270  
 280  
 290  
 300  
 310  
 320  
 330  
 340  
 350  
 360  
 370  
 380  
 390  
 400  
 410  
 420  
 430  
 440  
 450  
 460  
 470  
 480  
 490  
 500  
 510  
 520  
 530  
 540  
 550  
 560  
 570  
 580  
 590  
 600  
 610  
 620  
 630  
 640  
 650  
 660  
 670  
 680  
 690  
 700  
 710  
 720  
 730  
 740  
 750  
 760  
 770  
 780  
 790  
 800  
 810  
 820  
 830  
 840  
 850  
 860  
 870  
 880  
 890  
 900  
 910  
 920  
 930  
 940  
 950  
 960  
 970  
 980  
 990  
 1000  
 1010  
 1020  
 1030  
 1040  
 1050  
 1060  
 1070  
 1080  
 1090  
 1100  
 1110  
 1120  
 1130  
 1140  
 1150  
 1160  
 1170  
 1180  
 1190  
 1200  
 1210  
 1220  
 1230  
 1240  
 1250  
 1260  
 1270  
 1280  
 1290  
 1300  
 1310  
 1320  
 1330  
 1340  
 1350  
 1360  
 1370  
 1380  
 1390  
 1400  
 1410  
 1420  
 1430  
 1440  
 1450  
 1460  
 1470  
 1480  
 1490  
 1500  
 1510  
 1520  
 1530  
 1540  
 1550  
 1560  
 1570  
 1580  
 1590  
 1600  
 1610  
 1620  
 1630  
 1640  
 1650  
 1660  
 1670  
 1680  
 1690  
 1700  
 1710  
 1720  
 1730  
 1740  
 1750  
 1760  
 1770  
 1780  
 1790  
 1800  
 1810  
 1820  
 1830  
 1840  
 1850  
 1860  
 1870  
 1880  
 1890  
 1900  
 1910  
 1920  
 1930  
 1940  
 1950  
 1960  
 1970  
 1980  
 1990  
 2000  
 2010  
 2020  
 2030  
 2040  
 2050  
 2060  
 2070  
 2080  
 2090  
 2100  
 2110  
 2120  
 2130  
 2140  
 2150  
 2160  
 2170  
 2180  
 2190  
 2200  
 2210  
 2220  
 2230  
 2240  
 2250  
 2260  
 2270  
 2280  
 2290  
 2300  
 2310  
 2320  
 2330  
 2340  
 2350  
 2360  
 2370  
 2380  
 2390  
 2400  
 2410  
 2420  
 2430  
 2440  
 2450  
 2460  
 2470  
 2480  
 2490  
 2500  
 2510  
 2520  
 2530  
 2540  
 2550  
 2560  
 2570  
 2580  
 2590  
 2600  
 2610  
 2620  
 2630  
 2640  
 2650  
 2660  
 2670  
 2680  
 2690  
 2700  
 2710  
 2720  
 2730  
 2740  
 2750  
 2760  
 2770  
 2780  
 2790  
 2800  
 2810  
 2820  
 2830  
 2840  
 2850  
 2860  
 2870  
 2880  
 2890  
 2900  
 2910  
 2920  
 2930  
 2940  
 2950  
 2960  
 2970  
 2980  
 2990  
 3000  
 3010  
 3020  
 3030  
 3040  
 3050  
 3060  
 3070  
 3080  
 3090  
 3100  
 3110  
 3120  
 3130  
 3140  
 3150  
 3160  
 3170  
 3180  
 3190  
 3200  
 3210  
 3220  
 3230  
 3240  
 3250  
 3260  
 3270  
 3280  
 3290  
 3300  
 3310  
 3320  
 3330  
 3340  
 3350  
 3360  
 3370  
 3380  
 3390  
 3400  
 3410  
 3420  
 3430  
 3440  
 3450  
 3460  
 3470  
 3480  
 3490  
 3500  
 3510  
 3520  
 3530  
 3540  
 3550  
 3560  
 3570  
 3580  
 3590  
 3600  
 3610  
 3620  
 3630  
 3640  
 3650  
 3660  
 3670  
 3680  
 3690  
 3700  
 3710  
 3720  
 3730  
 3740  
 3750  
 3760  
 3770  
 3780  
 3790  
 3800  
 3810  
 3820  
 3830  
 3840  
 3850  
 3860  
 3870  
 3880  
 3890  
 3900  
 3910  
 3920  
 3930  
 3940  
 3950  
 3960  
 3970  
 3980  
 3990  
 4000  
 4010  
 4020  
 4030  
 4040  
 4050  
 4060  
 4070  
 4080  
 4090  
 4100  
 4110  
 4120  
 4130  
 4140  
 4150  
 4160  
 4170  
 4180  
 4190  
 4200  
 4210  
 4220  
 4230  
 4240  
 4250  
 4260  
 4270  
 4280  
 4290  
 4300  
 4310  
 4320  
 4330  
 4340  
 4350  
 4360  
 4370  
 4380  
 4390  
 4400  
 4410  
 4420  
 4430  
 4440  
 4450  
 4460  
 4470  
 4480  
 4490  
 4500  
 4510  
 4520  
 4530  
 4540  
 4550  
 4560  
 4570  
 4580  
 4590  
 4600  
 4610  
 4620  
 4630  
 4640  
 4650  
 4660  
 4670  
 4680  
 4690  
 4700  
 4710  
 4720  
 4730  
 4740  
 4750  
 4760  
 4770  
 4780  
 4790  
 4800  
 4810  
 4820  
 4830  
 4840  
 4850  
 4860  
 4870  
 4880  
 4890  
 4900  
 4910  
 4920  
 4930  
 4940  
 4950  
 4960  
 4970  
 4980  
 4990  
 5000  
 5010  
 5020  
 5030  
 5040  
 5050  
 5060  
 5070  
 5080  
 5090  
 5100  
 5110  
 5120  
 5130  
 5140  
 5150  
 5160  
 5170  
 5180  
 5190  
 5200  
 5210  
 5220  
 5230  
 5240  
 5250  
 5260  
 5270  
 5280  
 5290  
 5300  
 5310  
 5320  
 5330  
 5340  
 5350  
 5360  
 5370  
 5380  
 5390  
 5400  
 5410  
 5420  
 5430  
 5440  
 5450  
 5460  
 5470  
 5480  
 5490  
 5500  
 5510  
 5520  
 5530  
 5540  
 5550  
 5560  
 5570  
 5580  
 5590  
 5600  
 5610  
 5620  
 5630  
 5640  
 5650  
 5660  
 5670  
 5680  
 5690  
 5700  
 5710  
 5720  
 5730  
 5740  
 5750  
 5760  
 5770  
 5780  
 5790  
 5800  
 5810  
 5820  
 5830  
 5840  
 5850  
 5860  
 5870  
 5880  
 5890  
 5900  
 5910  
 5920  
 5930  
 5940  
 5950  
 5960  
 5970  
 5980  
 5990  
 6000  
 6010  
 6020  
 6030  
 6040  
 6050  
 6060  
 6070  
 6080  
 6090  
 6100  
 6110  
 6120  
 6130  
 6140  
 6150  
 6160  
 6170  
 6180  
 6190  
 6200  
 6210  
 6220  
 6230  
 6240  
 6250  
 6260  
 6270  
 6280  
 6290  
 6300  
 6310  
 6320  
 6330  
 6340  
 6350  
 6360  
 6370  
 6380  
 6390  
 6400  
 6410  
 6420  
 6430  
 6440  
 6450  
 6460  
 6470  
 6480  
 6490  
 6500  
 6510  
 6520  
 6530  
 6540  
 6550  
 6560  
 6570  
 6580  
 6590  
 6600  
 6610  
 6620  
 6630  
 6640  
 6650  
 6660  
 6670  
 6680  
 6690  
 6700  
 6710  
 6720  
 6730  
 6740  
 6750  
 6760  
 6770  
 6780  
 6790  
 6800  
 6810  
 6820  
 6830  
 6840  
 6850  
 6860  
 6870  
 6880  
 6890  
 6900  
 6910  
 6920  
 6930  
 6940  
 6950  
 6960  
 6970  
 6980  
 6990  
 7000  
 7010  
 7020  
 7030  
 7040  
 7050  
 7060  
 7070  
 7080  
 7090  
 7100  
 7110  
 7120  
 7130  
 7140  
 7150  
 7160  
 7170  
 7180  
 7190  
 7200  
 7210  
 7220  
 7230  
 7240  
 7250  
 7260  
 7270  
 7280  
 7290  
 7300  
 7310  
 7320  
 7330  
 7340  
 7350  
 7360  
 7370  
 7380  
 7390  
 7400  
 7410  
 7420  
 7430  
 7440  
 7450  
 7460  
 7470  
 7480  
 7490  
 7500  
 7510  
 7520  
 7530  
 7540  
 7550  
 7560  
 7570  
 7580  
 7590  
 7600  
 7610  
 7620  
 7630  
 7640  
 7650  
 7660  
 7670  
 7680  
 7690  
 7700  
 7710  
 7720  
 7730  
 7740  
 7750  
 7760  
 7770  
 7780  
 7790  
 7800  
 7810  
 7820  
 7830  
 7840  
 7850  
 7860  
 7870  
 7880  
 7890  
 7900  
 7910  
 7920  
 7930  
 7940  
 7950  
 7960  
 7970  
 7980  
 7990  
 8000  
 8010  
 8020  
 8030  
 8040  
 8050  
 8060  
 8070  
 8080  
 8090  
 8100  
 8110  
 8120  
 8130  
 8140  
 8150  
 8160  
 8170  
 8180  
 8190  
 8200  
 8210  
 8220  
 8230  
 8240  
 8250  
 8260  
 8270  
 8280  
 8290  
 8300  
 8310  
 8320  
 8330  
 8340  
 8350  
 8360  
 8370  
 8380  
 8390  
 8400  
 8410  
 8420  
 8430  
 8440  
 8450  
 8460  
 8470  
 8480  
 8490  
 8500  
 8510  
 8520  
 8530  
 8540  
 8550  
 8560  
 8570  
 8580  
 8590  
 8600  
 8610  
 8620  
 8630  
 8640  
 8650  
 8660  
 8670  
 8680  
 8690  
 8700  
 8710  
 8720  
 8730  
 8740  
 8750  
 8760  
 8770  
 8780  
 8790  
 8800  
 8810  
 8820  
 8830  
 8840  
 8850  
 8860  
 8870  
 8880  
 8890  
 8900  
 8910  
 8920  
 8930  
 8940  
 8950  
 8960  
 8970  
 8980  
 8990  
 9000  
 9010  
 9020  
 9030  
 9040  
 9050  
 9060  
 9070  
 9080  
 9090  
 9100  
 9110  
 9120  
 9130  
 9140  
 9150  
 9160  
 9170  
 9180  
 9190  
 9200  
 9210  
 9220  
 9230  
 9240  
 9250  
 9260  
 9270  
 9280  
 9290  
 9300  
 9310  
 9320  
 9330  
 9340  
 9350  
 9360  
 9370  
 9380  
 9390  
 9400  
 9410  
 9420  
 9430  
 9440  
 9450  
 9460  
 9470  
 9480  
 9490  
 9500  
 9510  
 9520  
 9530  
 9540  
 9550  
 9560  
 9570  
 9580  
 9590  
 9600  
 9610  
 9620  
 9630  
 9640  
 9650  
 9660  
 9670  
 9680  
 9690  
 9700  
 9710  
 9720  
 9730  
 9740  
 9750  
 9760  
 9770  
 9780  
 9790  
 9800  
 9810  
 9820  
 9830  
 9840  
 9850  
 9860  
 9870  
 9880  
 9890  
 9900  
 9910  
 9920  
 9930  
 9940  
 9950  
 9960  
 9970  
 9980  
 9990  
 10000

FIG. 6E

330  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp  
 AAA CTG CTG ATT TAG TGG GCA TGC GCT AGC GAA TCT GGG GTC CTT GAT  
 340  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser  
 CCG TTC ACA GGC AGT GCA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGG  
 350  
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
 AGT GTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
 360  
 ACC TAT 380  
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu  
 AGC TAT GGC CTC ACC TTT GCT GGT GGG ACC AAG CTG GTG CTG ALO CTA  
 370  
 Eco47 III 400  
 Ser Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Lys Asp Asp Ala Lys  
 AGC GGT GAT GAT GCT AAG AAG GAC GCA AAA AAG GAG GAC GCA AAA  
 410  
 Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp  
 AAG GAT GAT GCA AAA AAG GAT CTG GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC  
 420  
 Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala  
 GCT GAG TTG GTG AAA CTT GGC GCT TCA GTG AAG ATT TCT TGC AAG GCT  
 430  
 440  
 450  
 460  
 470  
 480  
 490  
 500  
 510  
 520  
 530  
 540  
 550  
 560  
 570  
 580  
 590  
 600  
 610  
 620  
 630  
 640  
 650  
 660  
 670  
 680  
 690  
 700  
 710  
 720  
 730  
 740  
 750  
 760  
 770  
 780  
 790  
 800  
 810  
 820  
 830  
 840  
 850  
 860  
 870  
 880  
 890  
 900  
 910  
 920  
 930  
 940  
 950  
 960  
 970  
 980  
 990  
 1000  
 1010  
 1020  
 1030  
 1040  
 1050  
 1060  
 1070  
 1080  
 1090  
 1100  
 1110  
 1120  
 1130  
 1140  
 1150  
 1160  
 1170  
 1180  
 1190  
 1200  
 1210  
 1220  
 1230  
 1240  
 1250  
 1260  
 1270  
 1280  
 1290  
 1300  
 1310  
 1320  
 1330  
 1340  
 1350  
 1360  
 1370  
 1380  
 1390  
 1400  
 1410  
 1420  
 1430  
 1440  
 1450  
 1460  
 1470  
 1480  
 1490  
 1500  
 1510  
 1520  
 1530  
 1540  
 1550  
 1560  
 1570  
 1580  
 1590  
 1600  
 1610  
 1620  
 1630  
 1640  
 1650  
 1660  
 1670  
 1680  
 1690  
 1700  
 1710  
 1720  
 1730  
 1740  
 1750  
 1760  
 1770  
 1780  
 1790  
 1800  
 1810  
 1820  
 1830  
 1840  
 1850  
 1860  
 1870  
 1880  
 1890  
 1900  
 1910  
 1920  
 1930  
 1940  
 1950  
 1960  
 1970  
 1980  
 1990  
 2000  
 2010  
 2020  
 2030  
 2040  
 2050  
 2060  
 2070  
 2080  
 2090  
 2100  
 2110  
 2120  
 2130  
 2140  
 2150  
 2160  
 2170  
 2180  
 2190  
 2200  
 2210  
 2220  
 2230  
 2240  
 2250  
 2260  
 2270  
 2280  
 2290  
 2300  
 2310  
 2320  
 2330  
 2340  
 2350  
 2360  
 2370  
 2380  
 2390  
 2400  
 2410  
 2420  
 2430  
 2440  
 2450  
 2460  
 2470  
 2480  
 2490  
 2500  
 2510  
 2520  
 2530  
 2540  
 2550  
 2560  
 2570  
 2580  
 2590  
 2600  
 2610  
 2620  
 2630  
 2640  
 2650  
 2660  
 2670  
 2680  
 2690  
 2700  
 2710  
 2720



FIG. 7C

380 Ser Leu Asp Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gln Thr Ser Val Thr Val Ser  
TCC CTC AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 1534

400 Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Lys Lys Lys Asp Asp  
TCA CTA ACC GCA GAT GAC GCA AGG AAA CAC CCA GCT AAA AAA GAC GAT 1582

410 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAC 1630

430 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser  
TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GGC GAG AAC GAT ACT TTG ACC 1678

450 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Cln Lys Asn Tyr  
TCC AAG TCC AGT CAG ACC CTT TTA TAT ACT GGT AAT CAA AAG AAC TAC 1726

460 Leu Ala Trp Tyr Cln Cln Lys Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
AAG CCG ACC ATG GTC CTC 1774

480 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
TAC TGG GCA TCC GCT AGG CAA TCT GGG GTC CTT GAT CCG TTC ACA GGC 1822

490 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ile Lys Lys Asp Ala Ala  
CTC ACC CTC TCC TCA CTA ACC GCA GAT GAC CCA AAG AAA GAC GCA CTT 1150

510 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Cln  
AAA AAA GAC GAT GGC AAA AAG GAT CAC GGC AAG AAA GAT CTT GAG GTT 1198

530 Cln Leu Cln Ser Asp Ala Cln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val  
CAG TTG CAG CAG TCT CAC GCT GAG TTG CTG AAA CTT CCG GCT TCA GTG 1296

550 Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile  
AAG ATT TCC TCC AAG CCG TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAA ATT 1294

570 His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Cln Gly Leu Gln Trp Ile Gly Tyr  
CAC TCG GTG AAA CAG AAC CTT CAA CAG GGC CTG GAA TGG ATT CCA TAT 1392

590 Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Asp Gln Arg Phe Lys Gly  
TTT TCT CCG GGA AAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG ACG TTC AAG GGC 1390

610 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Val Cln  
AAG GCC ACA CTA CTA CCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GGC TAC CTA CAG 1438

630 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Cln Asp Ser Ala Cln CTA TCT TTC TGT ACA AGA  
CTC AAC ACC CTC ACA TCT GAT GAT TCT CTA CTA TCT TTC TGT ACA AGA 1486

FIG. 7E

380 Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gln Thr Ser Val Thr Val Ser  
TCC CTC AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 1534

400 Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Lys Lys Lys Asp Asp  
TCA CTA ACC GCA GAT GAC GCA AGG AAA CAC CCA GCT AAA AAA GAC GAT 1582

410 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAC 1630

430 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser  
TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GGC GAG AAC GAT ACT TTG ACC 1678

450 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Cln Lys Asn Tyr  
TCC AAG TCC AGT CAG ACC CTT TTA TAT ACT GGT AAT CAA AAG AAC TAC 1726

460 Leu Ala Trp Tyr Cln Cln Lys Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
AAG CCG ACC ATG GTC CTC 1774

480 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
TAC TGG GCA TCC GCT AGG CAA TCT GGG GTC CTT GAT CCG TTC ACA GGC 1822

490 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr  
AGT GCA TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ACC AGT CTC AAG ACT 1870

510 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Cln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu  
CAA GAC CTG CCA CTT TAT TAC TCT CAG CAC TAT TAT ACC TAT CCG CTC 1918

530 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
ACG TTC CTT GCT CCG ACC AAG CTG CTG CTT AAG TAA AAA GCT ACC GAT 1966

550 GAA TCC GTC AAA ACA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT  
SOP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC ACT GAA CCA CTA GTT 2014

570 CAT ATC ATT CTC CCG CAA TGG TGT GCG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT  
PENTSEQ2- G TAT TTC ACT GAA CCA CTA GTT 2062

590 AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC CCG AAA ATC GGT CTG CCG GAA AAG ACC  
SOP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC ACT GAA CCA CTA GTT 2110

610 CCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT CCG TTG GAT TGT CAC AAA ATT  
BANK I 2158

630 CCC ATC C-3' 2165

FIG. 7D

380 Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gln Thr Ser Val Thr Val Ser  
TCC CTC AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 1534

400 Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Lys Lys Lys Asp Asp  
TCA CTA ACC GCA GAT GAC GCA AGG AAA CAC CCA GCT AAA AAA GAC GAT 1582

410 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAC 1630

430 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser  
TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GGC GAG AAC GAT ACT TTG ACC 1678

450 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Cln Lys Asn Tyr  
TCC AAG TCC AGT CAG ACC CTT TTA TAT ACT GGT AAT CAA AAG AAC TAC 1726

460 Leu Ala Trp Tyr Cln Cln Lys Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
AAG CCG ACC ATG GTC CTC 1774

480 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
TAC TGG GCA TCC GCT AGG CAA TCT GGG GTC CTT GAT CCG TTC ACA GGC 1822

490 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ile Lys Lys Asp Ala Ala  
CTC ACC CTC TCC TCA CTA ACC GCA GAT GAC CCA AAG AAA GAC GCA CTT 1150

510 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Cln  
AAA AAA GAC GAT GGC AAA AAG GAT CAC GGC AAG AAA GAT CTT GAG GTT 1198

530 Cln Leu Cln Ser Asp Ala Cln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val  
CAG TTG CAG CAG TCT CAC GCT GAG TTG CTG AAA CTT CCG GCT TCA GTG 1296

550 Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile  
AAG ATT TCC TCC AAG CCG TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAA ATT 1294

570 His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Cln Gly Leu Gln Trp Ile Gly Tyr  
CAC TCG GTG AAA CAG AAC CTT CAA CAG GGC CTG GAA TGG ATT CCA TAT 1392

590 Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Asp Gln Arg Phe Lys Gly  
TTT TCT CCG GGA AAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG ACG TTC AAG GGC 1390

610 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Val Cln  
AAG GCC ACA CTA CTA CCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GGC TAC CTA CAG 1438

630 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Cln Asp Ser Ala Cln CTA TCT TTC TGT ACA AGA  
CTC AAC ACC CTC ACA TCT GAT GAT TCT CTA CTA TCT TTC TGT ACA AGA 1486

FIG. 7F

380 Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gln Thr Ser Val Thr Val Ser  
TCC CTC AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 1534

400 Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Lys Lys Lys Asp Asp  
TCA CTA ACC GCA GAT GAC GCA AGG AAA CAC CCA GCT AAA AAA GAC GAT 1582

410 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAC 1630

430 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser  
TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GGC GAG AAC GAT ACT TTG ACC 1678

450 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Cln Lys Asn Tyr  
TCC AAG TCC AGT CAG ACC CTT TTA TAT ACT GGT AAT CAA AAG AAC TAC 1726

460 Leu Ala Trp Tyr Cln Cln Lys Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
AAG CCG ACC ATG GTC CTC 1774

480 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
TAC TGG GCA TCC GCT AGG CAA TCT GGG GTC CTT GAT CCG TTC ACA GGC 1822

490 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr  
AGT GCA TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ACC AGT CTC AAG ACT 1870

510 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Cln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu  
CAA GAC CTG CCA CTT TAT TAC TCT CAG CAC TAT TAT ACC TAT CCG CTC 1918

530 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
ACG TTC CTT GCT CCG ACC AAG CTG CTG CTT AAG TAA AAA GCT ACC GAT 1966

550 GAA TCC GTC AAA ACA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT  
SOP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC ACT GAA CCA CTA GTT 2014

570 CAT ATC ATT CTC CCG CAA TGG TGT GCG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT  
PENTSEQ2- G TAT TTC ACT GAA CCA CTA GTT 2062

590 AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC CCG AAA ATC GGT CTG CCG GAA AAG ACC  
SOP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC ACT GAA CCA CTA GTT 2110

610 CCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT CCG TTG GAT TGT CAC AAA ATT  
BANK I 2158

630 CCC ATC C-3' 2165



平成8年9月1日

特許庁長官 高 島 章 殿

## 1. 事件の表示

PCT/US93/12039

## 2. 発明の名称

多価の一本鎖抗体

## 3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

## 4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル

貴和特許法律事務所 電話 3504-0721

氏名 弁護士(7751) 石 田 敬

## 5. 補正命令の日付

自発補正

## 6. 補正の対象

(1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文

(2) 図面の翻訳文

(3) 委任状

## 7. 補正の内容

(1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の浄書(内容に変更なし)

(2) 図面の翻訳文の浄書(内容に変更なし)

(3) 別紙の通り



特表平7-503622 (16)

## 国際調査報告

PCT/US 93/12039	
IPC 5 C12N15/11 C07K15/20 C12N15/62 A61K39/395	
According to International Patent Classification (IPC) or its latest amended classification and CPC	
PCT/US 93/12039	
IPC 5 C12N C07K	
Classification according to the International Patent Classification (IPC) or its latest amended classification and CPC	
Classification according to the International Patent Classification (IPC) or its latest amended classification and CPC	
E. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Relevance to claim No.
X	WO/A, 91 19739 (CELLTECH LIMITED) 26 December 1991 see example 1
Y	—
Y	CANCER RESEARCH vol. 62, no. 12, 15 June 1992, PHILADELPHIA, PA, USA pages 3402 - 3408 T. YOKATA ET AL. 'Rapid tumour penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms' see page 3403, column 1, paragraph 4
Further documents are listed in the annexes of this report.	
Further documents are listed in the annexes of this report.	
Date of the latest completion of the international search report	
26 March 1994	
Date of the latest completion of the international search report	
27 -04- 1994	
Author's address	
Cupertino, CA	

## 国際調査報告

PCT/US 93/12039	
E. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Relevance to claim No.
Y	BIOCHEMISTRY vol. 30, no. 42, 22 October 1991, EASTON, PA US pages 10117 - 10125 M. V. PANTOLIANO ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli' cited in the application see page 10120, column 1, paragraph 2
X	EP/A, 0 506 124 (TANOX BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 4
P, X	WO/A, 93 11161 (EXON, INC.) 10 June 1993 see figure 18A

## 国際調査報告

PCT/US 93/12039	
E. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Relevance to claim No.
Y	WO-A-9119739 26-12-91 AU-A- 7843191 07-01-92 EP-A- 0486652 27-05-92 GB-A- 2280999 24-08-92 JP-T- 0562039 18-04-93
Y	EP-A-0506124 30-09-92 AU-B- 640563 08-09-93 AU-A- 1299282 15-10-92 JP-A- 0117164 14-05-93
Y	WO-A-9311193 10-06-93 AU-A- 3178993 28-05-93



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 18/46		8318 -4H	
C 1 2 N 15/09	Z N A		
/(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:19)			

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//C12P 21/08

C12R 1:19 )

【F1】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 続 補 正 書

平成9年7月2日

特許庁長官 茂 井 秀 光 殿

## 1. 事件の表示

平成6年特許第511437号

## 2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザ グラ ケミカル カンパニー

## 3. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門五丁目5番1号 虎ノ門ビル

青利特許法律事務所 電話 03-5470-1930

氏名 弁護士(7751) 石 比 敬

## 4. 補正対象事項名

明細書及び請求の範囲

## 5. 補正対象項目名

明細書及び請求の範囲

## 6. 補正の内容

- (1) 明細書を前記の通り補正します。
- (2) 請求の範囲を前記の通り補正します。
7. 添付書類の目録
- (1) 明 細 書 1通
- (2) 請求の範囲 1通



明 細 書

多価の一本鎖抗体

本発明は、本類の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に応じて免疫系により生成されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は4鎖体、又はその複合体であり、鎖鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変ドメインと一本の定常ドメインとより成り、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>と称される可変ドメインは、イムノグロブリンに特異性を決定し、他方、定常ドメインは増やなエフェクター機能をもちあわす。

アミノ酸配列データベースは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的高保守されたフレームワーク領域(FR)によりフランクされている3つの相隣性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変性ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の特異性の原因であると想定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五価性IgMクラスは5つの同一の結合部位を有している。

同一の遺伝子系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は特許及び治療の両方として商業とされている。モノクローナル抗体は、遺伝子下流に遺伝子マウスのリンパ球と適当なマウスミエロマ細胞系との融合により作られたハイブリドマにより巨量的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発される抗マウス抗体形成に基づき制約されている。

モノクローナル抗体であって、一の鎖に由来する抗体の場合又は可変領域が別の鎖に由

果する抗体の定常領域と組合されたものが従来の B細胞方法論により作られている。例えば、Sahagran, J. Immunol., 137: 1086-1074 (1986); Sun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1985); Nishikawa, Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); 及び Lieh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 9439-9443 (1987) を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開発している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が實質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その細胞力学に影響を及ぼすタンパク質構造体のうちの主要部分を構成するFc領域を含有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、腫瘍組織に迅速に集積し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の抗体が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さな抗体フラグメントは高めの毛管透過性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV<sub>H</sub>と一本のV<sub>L</sub>とにより一本鎖抗体フラグメント(scFv)が作られており、これは8つのC<sub>H</sub>領域を含み、それらはペプチドリンカー(本発明特許第4,916,778号)により連結されたV<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>ポリペプチドを成しており、ここでLはペプチドリンカーを表している。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが互にV<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>であるscFvは以下特許第4,32,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べてscFvは一つのそれを持つため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、凡そその抗原結合特性を節約又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築を導導することが有利であろう。加えて、細胞組織上の特定のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベース所達を可能とする、又は両方もしくは診断成分の抗体構築を可能とする二価特異的である多価scFvを導導することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本のV<sub>H</sub>と一本のV<sub>L</sub>

ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合能力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。懸架において、本発明は抗体に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の可変可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の懸架において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗体に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー;

を含んで成る。別の懸架において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードするDNA配列を提供し、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー;

を含んで成る。この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が複数の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とされるであろう。

#### 図解の簡便化図解

図1は、V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub> (LH3) と V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> (LL3) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型二価一本鎖抗体 (Fv2) を示す

図2は CC49V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 1) のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を示す。

図5は CC49V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHLE (SEQ ID NO: 6) におけるCC49一本鎖抗体LH3のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHLE (SEQ ID NO: 8) におけるCC49一本鎖抗体LH3のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL3017及びpSL3018の構築を示す。

図9はプラスミド p49LHLEの構築を示す。

図10はプラスミド p49LHLEの構築を示す。

図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49scFvを用いた、融合因子としてデオキシリ糖化 (D49IgG) を用いる融合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の開示全体が引用することで本明細書に引入れる

概説、アミノ酸、ペプチド、保護基、毒性基等を略すとき、それらはBIOLOGICAL COMMISSION ON BIOLOGICAL NOMENCLATURE) 又は関連分野の真意に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>により成られる、ペプチドリンカー(L)によりV<sub>H</sub>ドメインに連結されたV<sub>L</sub>ドメインを含むポリペプチドを意味する。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインとの順序は定めておいて、V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>として表わされるポリペプチドが獲得であろう。「ドメイン」は、技術の慣習、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗体

フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>と

又は

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>

のV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチドリンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な懸架においては、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインの数は等しい。

本発明は、

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>、又はV<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>

で表わされうる多価の一本鎖抗体を提供する。

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub> (LH3) 及びV<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> (LL3) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型二価一本鎖抗体(Fv2)も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の遺伝及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。導出されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についてのDNA配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の経験が必要とされる。適当なDNA配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Servicesにより公開された Kabat の Sequences of Proteins of Immunological Interest 第4版 (1991) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を提示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローニングの経路として、遺伝子発現条件合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの区画に塩基型にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybrids, American Type Co



して多体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが選択的に対して特異的であるように、及び/又は選択的抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築される。

本発明は更に、他の知恵の隠微の診断及び/又は治療において有用な時に診断的な型組成成分も考慮しており、ここでこの選択的抗体はしばしば細胞の表面上で適用される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療時に当業者に告知の方法によって適合される。本発明の薬理組成物は自基準に公知の方法、例えば電泳の装置、透析又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その最なる例示を要する下記の表の考案により更に明かにする。

#### 表 1

BCIP	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドールホスフェート
bp	塩基対
Bis-Trisプロパン	(1, 3-ビス[トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
C3H	細胞性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	単量一本鎖抗体ダイマー
HP	高圧点電気泳動
Ibp	キロ塩基対
LD	Luria Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MES	2-(N-メチルピペリジン)エタンスルホン酸
MP	分子軌
YDT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリグ	オリゴヌクレオチド

PAGE	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PES	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCFVをコードする DNA配列を含むプラスミド
RICS	ラジオイムノアッセイ
RIT	ラジオイムノ治療
scFv	一本鎖抗体モノクローリンフラグメントモノマー
scFv2	共有結合した一本鎖抗体モノクローリンフラグメントダイマー
SBS	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス[ヒドロキシメチル]アミノメタン)
TBS	ワイーン20洗滌液
V <sub>H</sub>	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V <sub>L</sub>	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 表 2

CC49: ヒト腫瘍関連タンパク質72(TAG-72)に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. B9459として商標。

CC49Fv2: 重鎖のN-末端領域に結合している完全形より成るCC49の抗腫瘍抗体領域。

CC49scFv: ペプチドリンカーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Fv2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。Fvの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば: CC49Fv2は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC49V<sub>H</sub>ドメインと2本のV<sub>L</sub>ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V<sub>H</sub>(L)とV<sub>L</sub>(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHLH, LLHL, HLHL, HLHL及びHLLH。

#### プラスミド

**pSCFV-UM**: 22のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変重鎖とCC49Fv2重鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

**pBILH<sub>1</sub>**又は**pBILH<sub>2</sub>**: CC49scFv2 LHC又はLHLH4成分のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 実施例

##### 一般技術

分子クローニングのための手順は、その科学内容を引用することで本明細書に組み入れられる。Sambrookら, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Press, New York 2版 (1989) 及び Ausubelら, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

##### オリゴヌクレオチドの合成及び増幅

オリゴヌクレオチド(オリグ)は全て、塩基の5'-アミノホスホキチン酸及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 381 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその乾燥混合物を33-40 µlの滅菌水の中に再溶解させた。ポリアクリルアミド-原液が100 µlの滅菌水の量、オリグを塩化アンモニウム(V)を用いて可溶性とした。BIBバンドをゲルから切り出し、そして1 Mの100 mMのトリス-酢酸、pH 7.4、50 mMのNaCl、5 mMのDTAの中で55℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSepa-Pac(商標) C-18カラム (Millipore, Bedford, MA) に適用し、そして結合したオリグを80%のメタノールで溶出させることによって行った。その溶出の体積を約50 mlに下げ、そしてDNA濃度を200 ng (OD<sub>260</sub>)での光学密度を測定することによって決定した。

##### 酵素消化処理

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD),

New England Biolabs, Inc. (Eversett, MA) 又はBoehringer Mannheim (Mannheim, Germany) からの酵素及び緩衝液を用い、その製造者の提供する手順に従って実施した。消化させた混合物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをニチロウムブロムドで染色し、そのDNAバンドを短波紫外光により増感させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5 mMのトリス、2 mMの酢酸、1 mMのEDTA、pH 8.0を含む透析チューブ (Bio-Lab Cartridge Corp., Chicopee) の中に入れた。そしてMax Submariner電気泳動装置(Boehringer Scientific Instruments, CA)を用いて凍結させた。タンパク質をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール法で沈降させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

##### 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, *Can. Res.* 46: 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調整したTAG-72抗原を、ポリアクリルアミド36穴マイクロタイツプレート (Cytosol Laboratories, Inc., Chantilly, VA) のウェルの上に一度乾燥させたことで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 µlのPBS、0.05%のツイーン50で3回洗った。25 µlの抗腫瘍抗体及び25 µlのビオチニル化CC49 (1/20,000希釈率の: mg/mlの溶液) をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間、余剰な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる結合を検定するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 µg/mlのCC49及び10 µg/mlのCC49Fv2とした。陽性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又はBIBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの結合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50 µl (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 µlのパラニトロフェニルホスフェート溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) を加え、そして発色反応を最低20分待たせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー (Mu-

tecular Devices Corporation, Natick Park, CA)を用い101-430 nmでの光密度スキャンニングにより測定した。scfv2の場合は、発色の同時低下を伴うデオキシニル化GC19の低下をもたらした。

#### SPS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SBS-2458分析のためのサンプル(20μl)を、非還元型サンプル変性バッファ(SBS-2458) (Integrated Separation Systems, Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより滅菌し、そして、0-20%勾配のポリアクリルアミド Gel (Bio-Rad)にその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル面95mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをタマシブリアントブルー-R 250 (Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子重量標準は予め定められており(Mid Range kit, Diversified Bio-tech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼB、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オバラムミン、ラクトートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、ヨウ化グルタマート及びナトリウム。これらの分子重量はそれぞれ85,000、55,000、43,000、38,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルを移動した。電気泳動後、ゲルの一方を過塩素酸パーオキシド(0.1Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15-20分間平置した。Immobilon P PVD (ポリビニルピロリドン)膜 (Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分間処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に過塩素酸パーオキシドの中で3分間処理した。Milliblot-SDE 装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をその膜に転写するために用いた。一滴の過塩素酸パーオキシドを膜の電極部の中央に載せた。Whattman 3MM 濾紙のシートを過塩素酸パーオキシドの中に浸し、そしてその電極面の上に均等に置いた。過塩素酸パーオキシド(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濾紙のPVD膜を加え、平衡ゲルをその上に置き、そして最後に過塩素酸パーオキシド(40mMのグリシン中の25mMのトリス-HCl, pH10.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mAの定電流(初期電圧は8-20V)に調節した)を用いて30分で進められた。

ブロットした後、その膜を水の中で洗浄にすぎ、そして20mMのブロッッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を含有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、牛血清粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を提供する。これらの膜を最少限1時間は、室温でブロッッキングし、そして20mlづつ0.5%の Tween-20洗浄液(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlの Tween-20(1% solution)をTTBSのリッシャー当り混合した。使用したブローアップ液は20mMのデオキシニル化FA10 14溶液とした(10μg/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mMのTTBS当り1gのBSAを加えることにより作った。室温で30-60分ブローアップした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温で30-60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの結合されたストレプトアビジン(Streptavidin Bio technology Associates, Birminghham, AL) 20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20mM)の中で2分洗った。このバッファは、0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1Mの NaCl、0.01Mの pH8.8とした。アルカリホスファターゼのための基質を作るため、ニトロブルー-テトラゾリウム(NBT)クロライド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-3-インドロ-3-インドロホルムスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-3-インドロ-3-インドロホルムスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液を、Promegaよりウェスタン染色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色液からそれを水で洗い流した。

#### デオキシニル化 FA10 14

FA10 14は、GC19に対して特異的な、ATCC No. 29112として寄託されているE. coliの反-イデオタイプ抗体(1:622, X-アノソグロブリン)である。FA10 14は Mycena Protein A アフィニティカラム (Tonkora, NY)を用いて精製した。製

造者のプロトコールに従ったが、ただし希釈率として、0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。固分を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH7に中和した。デオキシニル化反応は上記の通りに設定した。FA10 14(1mg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNaOH、pH 9.8と混合した。デオキシニル化反応は、カルボイメチル化(1.5mg)を0.5mlのジメチルホルムアミドの中に溶かした。Biotin-X-MS 溶液(20μl)をFA10 14溶液に加え、そして22℃で1時間反応させた。過剰のデオキシニル化反応物を、Pharmacia Amersham 12 4810/30カラム (Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8μl/minの流速で、デオキシニル化 FA10 14は16.8minのピークで示された。このピークを構成する成分をブールし、そして4℃で凍蔵し、そしてGC19、及びFA10 14により検出されるGC19イデオタイプを検出するに用いた。

#### 電気泳動(电泳) (EP)

等電点 (pI) は、DAS-XX (Madison, WI)を介して入手できる PROT31N-TITRA 17という名のコンピュータプログラムを用いて決定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えて等電点が算出された。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計算はCに置換し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、Isoprepアゲロース IEFプレート、18cm×18cm (Bio-Rad, Rockland, ME)を用いて決定した。Bio-Rad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEFを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、bucセル (両側)、20mAの電流及び10Wの定電流とした。等電点法は90minで完了した。IEF産物はBio-Radより購入した。そのネットはフッ素樹脂、ヨウ化グルタマート、半炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンテリクテン及びナトリウムを含む。それらのpI値は4.85、5.10、6.00、6.50、7.00、7.10及び7.50、7.80、8.00及び8.20及び9.50である。ゲルを、PVCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

#### GC19抗体の免疫

Fig. scfv2の構造および分子量は、Fvを構成する重鎖(CD45)と軽鎖(CD45)とを、含有している1.3cmの長さの石英カラム(10μm)を用いて、Perkin-Elmer UV-Vis分光光度計254nmを用いて、タンパク質濃度の280nm波長の吸光度を測定して定量化した。モル吸光係数(E<sub>280</sub>)は、各抗体について、下記式を用いて算定した。

$$E_{280} = (Cys残基) \times 5,500 + (Tyr残基) \times 1,340 - ((Cys残基) \times 100 - (Phe残基) \times 10)$$

これらの値は、R. L. Waller, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375-378頁に記載されている情報に基づいている。

#### 高性能液体クロマトグラフィー

CD45scfv2を精製するために用いた高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン製配管を用いた HPLC システムを使用した。このシステムは、2130型HPLCポンプ、2122型自動溶剤、2100の吸光度に設定された UV 1000 S II 2238 型検出装置および2111型 Superfloc fraction collectorで構成されている。

#### サブユニットの PEGによる製法

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(μg)のプラスミドDNA (p8CFV2)と100ピコモルのプライマー: 1μlのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク市)の Ampli-tagポリメラーゼ: 16μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともに PEGキットに提供されている)に混合し、100μlにするのに充分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はプライマーが認識しているのほとんど同様に行った。これらの反応は、PCR 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて36サイクルを行った。その1サイクルは、94℃で20-45秒間の DNAの溶融; 50-60℃で 0.5-1.5分間のアニーリングおよび72℃で 0.5-2.0分間の伸張で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、フォスターシティ市)の3300型もしくは3810型 DNA合成器で合成し、次いで上記のようにして精製した。

#### リゲレーション



した。SCP10のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記の通りである。

SCP10: 5'-TAA TGC GCA GAT GAC GCA AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT  
GCC AAA AGG GAT GAG GCC AGC AAA GAT CTT GAC ATT CTC ATG TCA CAG TTT  
CC

下線をつけたヌクレオチドは PstI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記の通りである。

SCP8a: 5'-TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AGC CAG  
CAG CTT GGT GGC-3'

下線をつけた最初の 3 塩基は XhoI 部位に相当し、もう一つの塩基は AflII 部位に相当する。SCP70のヌクレオチド 8〜70はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド134〜162)、一方、Aにアミノ化するヌクレオチド77〜93は図7の1612〜1635に相当する。プライマー SCP8aは、その 3' 末端の近かいチール、NheI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位および V、の最後の 2 塩基を含有している。PstI と NheI による消化の後、この得られた (20μ) のインサートを精製して精製 pSL300HT ベクターの NheI と Eco47III の部位に連結し、候補的なクロノンを NheI と ItoI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されたか(461P32 (-)) と SGP1 で配列が決定されて、pSL300HT 中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記の通りである。

481P32 (-): 5'-CTC CTC GTA CCA GCC CAA G-3'

プラスミド pSL300HT を XhoI および NheI で消化し、精製し、得られた 1176 bp V、リンカー-V、リンカー-V、セグメントを pSCFV CHM に連結して、p40LHL を製造した。なおこの pSCFV CHM は同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応混合物(4μL 8分)を用いてコンピナント大腸菌 AG1 細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBCA 220 変大プレートにプレートした。正しい制限酵素型を有するプラスミドを含有する単クローンを、p40LHL を含有させるために選択した。p40LHL は、CC49 多価一本鎖抗体 scFv2: V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> または CC49scFv2 (LHL) の pscF プロモーターとヌクレオチド配列を含有している。

り次のステップで増殖させ、オリゴSCPGC (SEQ ID NO: 21) の末端に 5 塩基の欠失を製造することによって pSL300HT を製造した。

SCP6C: 5'-TAAGCCCTGATGTCGTAAGAGGAGCCGCCAAAAA  
CCACACCGAAAAAAGATGATGCAAAAAAGATCTCC  
AGCTTCAGTTGAGAGCTGAC-3'

SCP6C の下線をつけた配列は Eco47III 部位に相当する。PCR において、SCP6C は 5' オリゴとして用いられ一方 SCP10123 (-) オリゴとして用いられ、リンカー CC49V、セグメントが生成する。SCP10 のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 22)は「A」の通りである。

SCP10: 5'-TTC TGC TAG CTT TTT ATG AGC AGA GCG TGA  
CTC AGC TT 3'

SCP10 の下線をつけた配列は図 6 のヌクレオチド1938〜1939に見られる NheI 部位に相当する。この場合、PCR インサートは NheI だけで消化されたいで精製される。ベクター(pSL300HT)は Eco47III 部位(先に形成されている)および NheI 部位で消化されたいで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(8μL)を使ってコンピナント E. coli AG1 細胞を形質転換した。この形質転換細胞を LB-AMP100 プレート上にプレートし次いで候補的なクロノンを ItoI と NheI でスクリーニングした。正しい大きさの DNA を有する 3 個のクロノンを得た。これらのクロノンのうちの 2 個は、オリゴ49VLCOR3 (-) および SGP1 を用いて配列が決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCOR3 (-))の SEQ ID NO: 23)は下記の通りである。

49VLCOR3 (-): 5' CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクロノンが得られ、そして図 7 のヌクレオチド1533〜1562 からの配列が確認された。正しい pSL300LHL クローンを示した。

大腸菌中で増殖させるのに用いる最終的なプラスミド p40LHL を製造するために、pSL300LHL (5μg) を NheI と ItoI で消化し、次いで V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCFV UIM (5μg) を ItoI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製と連結した。上記連結混合物の 1μL (4μL) を使ってコンピナント大腸菌 AG1

## 実施例 2: p40LHL の構築

p40LHL の構築を図 10 に図式的に示す。リンカー-V、のサブユニットを 3' オリゴの SCP7b と 3' オリゴの SCP9 で製造した。

SCP7b: 5'-TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC  
ACC ACC AGC TTC CTC CCA G-3'

SCP7b オリゴ(ヌクレオチド 8〜70)は図 6 のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124〜1192に相当する)および図 6 の V、のフラグメント(1193〜1215)に相当する。PCR に対する pSCFV CHM 断片(ヌクレオチド77〜93)にアミノ化した。

SCP9 は、NheI 2 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47III 部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次の V 領域を受けるための pSL300LHL を作るのに必要な制限部位である。SCP9 のヌクレオチド18〜23は図 6 のヌクレオチド1532〜1537(リンカーの最初の 2 個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24〜45は、PCR における SCP9 (SEQ ID NO: 19)のアミノ酸配列である図 6 に示すヌクレオチド1508〜1531に相当する。プラスミド pSL300HT を Eco47III と NheI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め PstI と NheI で処理され精製された、PCR からリンカー CC49V、DNA インサートと連結させる。その連結混合物(3μL)を用いて大腸菌 AG1 コンピナント細胞を形質転換し、次いで正しい NheI - B 1 の大きなフラグメントを有する一つのコンピナント配列をオリゴ PEFV:SEQ2 を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 20)は下記の通りである。

5' TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAC G-3'

配列決定の結果は、得られた pSL300HT クローン中に PCR の誤りより欠失があるということを示した。図 8 にみられるヌクレオチド1533〜1537に相当する 5 塩基の欠失が欠けられ、そして T であるべきはずのヌクレオチド1531は XNA 配列のデータから確認したところ実際には G であった。得られた配列は、

5' ...TAAGCCGCTT... であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47III 部位を形成した。図 6 の AGCCCT の配列はヌクレオチド1530、1531、1532、1533、1539 および 1540 に相当する。この 20 μ

細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物を LB-AMP20 プレート上にプレートし、次いで p40LHL に対する代表的なクロノンを、正しい制限酵素型(図 10 参照)および TAA 72K に対する生物活性に基づいて選択した。

実施例 3: CC49 scFv2 の LHL と LHL が共有結合した二量体の精製

CC49 の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラスマ膜抽出物の成分を、p40LHL と p40LHL の両方の 1.2L の一級培養液から調製した。長約すると、培養物を 250mL づつの 4 部分に分割し、Sorvall GS-5 ロータで 10 分間 5300rpm で遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaCl を含有する 10mM トリス-HCl pH 7.36 からなる 100mL 中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計 100mL の 30mM トリス-HCl pH 7.36 で洗浄し、そして一つのチューブにプールした。このチューブで、10mM のスクロースを含有する 30mM トリス-HCl pH 7.36 (100mL) および 10mM EDTA pH 7.36 (20mL) を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に 10 分間保持した。高張性細胞(permeabilized cell)を精製のようにしてペレット化した。次のステップで洗浄を繰り返して、ペレットを 20mL の水(0.1mM NaCl)中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら水上に 10 分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の両辺膜抽出物の成分を含有する上澄み液を、0.4μm の Nalge 社(米国、ニュージャージー州、ロチェスター所在)の過濾膜で濾過することによってさらに精製し、次いで Amicon 社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)の Centrifuge 30 および Centrifuge 30 で 1.0mL より小さい容量まで濃縮した。

p40LHL または p40LHL のクロノン由来の両辺膜抽出物のシークレット (secret) を、Pharmacia 社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)の Superdex 75 HR 10/30 HPLC カラム(予め PBS で平衡化させたもの)に注入した。結合 ELISA で測定する場合、細胞の生成物は 0.5mL/分の流量で 21〜24 分間流出した。活性成分をプールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、ステータム 500 Microdialyzer Unit (Pierce Chemical 社)を用い、緩衝液を 3〜4 回交換しながら 800mM カリウムアセテートを使用して、20mM トリス-HCl pH 7.0 にして一度透析を行った。その試料を Pharmacia 社の Heparin 5 μmL/5 アニオン交換 HPLC カラムに注射した。緩衝液 A として 20mM トリス-HCl pH 7.0 を用い、緩衝液 B として



て20Mトリス-HCl pH 7.6に0.5M NaCl を含いる緩衝プログラムを、1.5ml/min の流量で使用した。同様の生成物は、緩衝 LISI5に於ける場合、各々3〜4分間カラムから放出された。この時点の両方の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクローンプリアントブルー250で染色し、他方のゲルはウエスタン分析（ブローブ抗体としてジオチニル化 IgG 14を使用）に移されたが、scFv2(LHL)またはLHL1 の種の計算分子量の単一バンドが、55,239ダルトンの位置に出現した。活性成分は各場合濃縮し、50mM PBS pH 8.8に対して一度透析し、次いで Pharmacia社のHoe 5 115/5 カチオン交換カラムに注射した。この陰イオンカラムからの分離の二つの部分のうちの1は、SEI TAG 法および ELISA法で測定する場合、免疫反応の開始される段階に放出された。したがってこれらの部分は実際にカラムに結合していたわけである。次いで成分5と6はさらに精製するためにブールした。

Hoe 5 カラムを活性Xeo 5 115について再度使用したが使用した緩衝液は20mM トリス-HCl pH 8.8であり、流量は0.8ml/minに低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Hoe 5 に残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5〜6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

#### 等電点電気泳動

精製物の等電点 (pI) は DEXSTAR社 (米国、ウエスコンシン州、マディソン所在地) のコンピュータプログラム Protein-tiltateを使用して予測した。アミノ酸組成、およびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社 (米国、メーン州、ロックランド所在地) のImaxel (EPアブソーブ範囲3〜10を使用して測定した。上記1EPを操作するために、Biorad社 (米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在地) の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、70mAで500V (既定) および一定電流の10Wであった。等電点電気泳動は30分間で完了した。Biorad社の1EP標準品は、フィコシアニン、グルタチオン、ウシカルボムクタンヒドラーゼ、ヒトカルボムクタンヒドラーゼ、ウミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒトマブリンゲンおよびシクロマ

Cが含まれ、pI値はそれぞれ4.55、5.13、6.00、6.50、7.00、7.50、7.8、8.0、9.20 および 9.6であった。ゲルは PNCの指示にしたがって染色し脱色した。DEXSTAR プログラムによって両方の scFv2の種の計算として、9.1の値が予測された。純品の生成物に対し、単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の6.9の位置にみとめられた。

IgG、scFv2 (LHL)およびLHL1) のような精製0.49%溶液は、280nm波長の吸光度を分光学的に測定することによって定量化した。モル吸光係数値は、各々、先に引用した Wellauerの式を用いて測定した。

そのす / 酸組成に基づいて、CC49IgG、CC49scFv2(LHL)、CC49 scFv2(LHL)およびCC49scFv2(LHL) (280nm) 値はそれぞれ1.43、1.65、1.85 および1.71であった。

#### 実施例4

CC49scFv2の種のLHL3とLHL1の相対活性を、IgGおよびG000Aに結合したFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合 (percent competition) を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\text{ゼロ競合} = \frac{\text{試料吸光度値 (30 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合} - 100\% \text{競合}} \times 100$$

"ゼロ競合 (zero competition)" 値は、1% BSAをジオチニル化CC49 (3×10<sup>-14</sup>モル) と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合はジオチニル化CC49と混合した CC49IgGの5 μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は402nm〜450nmで測定した。3回の試料値の平均値を使用した。最初に試料 (25 μL) を、TAG-72でコートしたマイクロサットプレートに、1.0×10.10 μLの結合部位/mLで塗布した。ジオチニル化CC49 (4 μg/μL 1:20,000に希釈、25 μL使用) で試料を1/2濃度に希釈した。遊離希釈法 (1:2) を行った。両方の形態の scFv2は IgGにはV等しい (図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体を Fabフラグメントと比較した。両者は一致であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二重体の両者の影響は、二つの充分に

機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の値に比べて今 IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49IgGの型と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一時的な4.4体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存の scFv分子に比べて、本発明の化合物は多量回注することができる、かつ癌治療に用いる免疫治療において腫瘍：組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本明細書に開示されている説明を実施することから、当技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と形態は以下の請求の範囲によって示される。

以上

#### 請求の範囲

1. 2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有結合されており、この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys  
Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして各フラグメントは:

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ペプチド;

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ペプチド; 及び

(c) この第一と第二のペプチドを機能的な結合性成分へと連結させる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. 前記軽鎖可変領域が下記の配列

Asp Ile Val Met Ser Cln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val  
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu  
Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg  
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala  
Val Tyr Tyr Cys Cln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

と実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前記軽鎖可変領域が下記の配列

Glu Val Gln Leu Cln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly  
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu  
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr

Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser  
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp  
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を示している。請求項1記載の多量の一価鎖状体。

3. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する。  
請求項1記載の多量の一価鎖状体。

4. 多量の一価鎖状体をコードする DNA配列であって、この多量の一価鎖状体  
が2本以上の一本鎖状体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが互質に対  
する相補性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカ  
ーを介して共有結合されておらず、そして各フラグメントは：

(a) 転写可能ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 翻訳可能ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合成分へと連絡せしめる  
第二のペプチドリンカー；

を含んで成る、DNA配列。

5. 前記第一ポリペプチドをコードする配列が下記の配列：

GAG ATT CTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT CTC TCA  
GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTC AGG TGC AAG TCC AGT CAG AGC  
CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC  
CAG CAG AAA CCA GGC CAG TCT CTT AAA CTG CTG ATT CAC TGG  
GCA TGC GCT AGC GAA TCT CGT GTC CTT GAT CCG TTC AEA GGC  
AGT GGA TCT GGC ACA GAT TTC ATT CTC TCC ATC AGC AGT CTG  
AAG ACT GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
AGC TAT CCC CTC AGG TTC GGT GCT GGC ACC AAG CTG CTG CTG  
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二ポリペプチドをコードする配列が下記の  
配列：

GAG GTT CAG TTC CAG CAG TCT GAC GGT GAG TTC CTG AAA GGT  
GGG GGT TCA CTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC  
TTC ACT GAG CAT GCA ATT CAC TCG CTG AAA CAG AAC CTT GAA  
CAG GGC CTG GAA TCG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT CAT  
GAT TTT AAA TAG AAT CAG AGG TTC AAG GGC AAG GCT ACA CTG  
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCC TAC CTG CAG CTC AAC  
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GCG TAT TTC TGT ACA AGA  
TGC CTG AAT ATG GCG TAC TCG GGT CAA GGA ACC TCA CTG AGG  
GTC TCC TCA

と実質的に同じである。請求項1記載の DNA配列。